

**Instituto de Politécnico de Beja**

**Escola Superior de Agrária**

**Mestrado em Engenharia Alimentar**

**Desenvolvimento de um Sumo de Romã e Morango Tratado  
por Altas Pressões Hidrostáticas**

**Maria Eduarda Trolha Medalhas**

**Beja**

**2020**

**Instituto de Politécnico de Beja**

**Escola Superior de Agrária**

**Mestrado em Engenharia Alimentar**

**Desenvolvimento de um Sumo de Romã Tratado por Altas  
Pressões Hidrostáticas**

**Dissertação de mestrado apresentada na Escola Superior de Agronomia do  
Instituto Politécnico de Beja**

**Relatório de estágio, realizado na empresa Vasco, Nuno & Cláudio Vieira, LDA,  
apresentada na Escola Agraria de Beja**

**Elaborado por:**

**Maria Eduarda Trolha Medalhas**

**Orientador:**

**Professor Doutor Carlos Ribeiro**

**Coorientador:**

**Professora Doutora Olga Amaral**

**Beja**

**2020**

## **Agradecimentos**

Antes de mais quero agradecer aos meus pais, António Medalhas e Maria Amélia Medalhas, por me terem ensinado ao longo destes anos de vida que não devemos desistir dos nossos sonhos e que devemos lutar sempre por aquilo que queremos e devemos estar constantemente a evoluir quer a nível pessoal e profissional.

Quero agradecer à empresa Vasco, Nuno & Cláudio Vieira, nomeadamente ao Vasco por todo o apoio demonstrado ao longo da elaboração desta dissertação, nomeadamente na elaboração do sumo.

Quero agradecer à colega Maria Bruno, pela ajuda na elaboração e preparação das análises realizadas durante este trabalho. Sem o apoio dela ser-me-ia difícil a obtenção dos resultados da parte experimental.

Quero agradecer a todos os elementos do laboratório de microbiologia do Instituto Politécnico de Beja da escola agrária, por todo o apoio e auxílio que me foi dado durante a realização das análises.

Quero agradecer ao meu orientador Carlos Ribeiro e à minha coorientadora Olga Amaral, por todo o apoio e dedicação demonstrado mesmo nos momentos mais difíceis que tive ao longo da realização da dissertação.

Agradeço o apoio prestado pelo Projeto INNOACE, atividade 3, ação 2, tarefa 5, no âmbito do qual o presente trabalho foi efetuado, no respeitante à ajuda prestada pelos respetivos investigadores no delineamento experimental e interpretação dos resultados, assim como na disponibilização de condições materiais.

Por fim, mas não menos importante um agradecimento ao meu namorado pelo apoio e paciência que teve sempre para comigo.

Sem o apoio de todos, não me seria possível a realização desta dissertação.

## **Resumo**

Este trabalho teve como objetivo o estudo da aplicação do tratamento de altas pressões hidrostáticas (HPP) (600 MPa, 480s, 10 °C) num sumo de romã (87%) e morango (13%) (m/m) e a sua conservação durante quatro semanas de armazenamento a  $3^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Analizou-se o pH, acidez titulável total, teor de humidade, cinza, cor por colorímetro, teor de fenóis totais, atividade antioxidante pelos métodos FRAP e TEAC, teor ácido ascórbico, contagem de microrganismos mesófilos aeróbios a 30°C, psicrófilos, bolores e leveduras e coliformes totais, antes e após o tratamento por HPP e durante as quatro semanas de armazenamento. O valor nutricional foi determinado antes e após o tratamento por HPP.

O tratamento por altas pressões e o período de conservação tiveram consequências mínimas sobre o resíduo seco solúvel, pH, acidez titulável e cinza. Quanto à cor, o brilho e a saturação aumentaram com o tratamento, e diminuíram com o tempo de conservação, tendendo para valores próximos, mas ligeiramente acima dos iniciais; os valores de tonalidade baixaram no sentido do vermelho, aumentando ligeiramente nas duas últimas semanas. Os fenóis totais e os valores de FRAP e TEAC, baixaram após a primeira semana tendendo para valores estáveis e ainda importantes em termos funcionais; o teor de ácido ascórbico aparentemente não foi afetado por quaisquer dos dois fatores (tratamento e tempo de conservação).

O tratamento por altas pressões baixou drasticamente o nível de contaminação microbiológica. Apesar de na segunda e terceira semana se ter verificado presença de coliformes, globalmente o tratamento foi eficaz.

Conclui-se que o tratamento por altas pressões hidrostáticas foi eficaz e manteve o sumo estável, podendo talvez o seu tempo de prateleira ser estendido para além das quatro semanas em condições de refrigeração.

**Palavras-chave:** sumo; romã; morango; altas pressões hidrostáticas; conservação.

## **Abstract**

This study aimed to study the effect that the high-pressure processing treatment (HPP) (600 MPa, 480s, 10 °C) has on 87% pomegranate and 13% strawberry (m/m) juice and its shelf-life for four weeks.

Dry soluble residue, pH, total titratable acidity, moisture content, ash, colour by colourimeter, total phenols, FRAP, TEAC, ascorbic acid, microbiological characterization (aerobic mesophilic microorganisms at 30°C, psychrophiles, moulds and yeasts and total coliforms) were performed before and after HPP and during shelf-life. Nutritional value was determined before and after HPP.

The HPP did not affect physical-chemical properties in general. Concerning colour, lightness and saturation increased after HPP, and decreased with shelf-life to levels slightly above the initial values; hue angle lowered in the red direction, increasing slightly in the last two weeks. HPP did not affect total phenol content, FRAP and TEAC levels, but these decreased after the first week, although subsequently tended to stabilise to yet important functional levels. Apparently ascorbic acid content was not affected by the two factors (HPP and shelf life).

HPP lowered drastically the microbiological contamination level. Although coliform presence was observed in second and third week, in generally HPP was efficient.

It was concluded that HPP was efficient in keeping the juice preserved raising the possibility their shelf-life might be extended beyond four weeks.

**Keywords:** juice; pomegranate; strawberry; high pressure processing; shelf-life.

## Índice Geral

<b>1. Enquadramento e objetivo.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Introdução .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Romã.....</b>	<b>2</b>
<b>2.2. Morango .....</b>	<b>3</b>
<b>2.3. Métodos térmicos e não térmicos .....</b>	<b>4</b>
<b>2.4. Tratamento de altas pressões hidroestáticas .....</b>	<b>5</b>
<b>3. Materiais e métodos.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1. Delineamento experimental .....</b>	<b>7</b>
<b>3.2. Extração do sumo .....</b>	<b>8</b>
<b>3.3. Tratamento de altas pressões hidroestáticas .....</b>	<b>8</b>
<b>3.4. Caracterização físico-química .....</b>	<b>9</b>
<b>3.4.1. Resíduo seco solúvel .....</b>	<b>9</b>
<b>3.4.2. pH.....</b>	<b>9</b>
<b>3.4.3. Acidez titulável total.....</b>	<b>9</b>
<b>3.4.4. Humidade .....</b>	<b>9</b>
<b>3.4.5. Cinza .....</b>	<b>9</b>
<b>3.4.6. Cor por colorímetro.....</b>	<b>10</b>
<b>3.5. Caraterização funcional.....</b>	<b>10</b>
<b>3.5.1. Procedimento para a obtenção dos extratos.....</b>	<b>10</b>
<b>3.5.2. Teor de fenóis totais.....</b>	<b>11</b>
<b>3.5.3. FRAP .....</b>	<b>11</b>
<b>3.5.4. TEAC .....</b>	<b>11</b>
<b>3.5.5. Ácido ascórbico .....</b>	<b>12</b>
<b>3.6. Caracterização microbiológica .....</b>	<b>12</b>
<b>3.6.1. Microrganismos aeróbios mesófilos a 30 °C e psicrófilos .....</b>	<b>13</b>
<b>3.6.2. Bolores e Leveduras.....</b>	<b>13</b>

3.6.3. Coliformes totais .....	13
3.7. Avaliação Nutricional.....	13
3.8. Tratamento dos dados .....	14
4. Resultados e Discussão .....	15
4.1. Caracterização físico-química .....	15
4.1.1. Teor de sólidos solúveis (°Brix), pH, acidez titulável.....	15
4.1.2. Humidade .....	19
4.1.3. Cinza .....	19
4.1.4. Cor .....	20
4.2. Caracterização funcional .....	24
4.2.1. Polifenóis totais .....	24
4.2.2. FRAP .....	26
4.2.3. TEAC .....	27
4.2.4. Ácido ascórbico .....	29
4.3. Avaliação nutricional .....	30
4.4. Caracterização microbiológica .....	30
5. Conclusões .....	33
5.1. Perspetivas Futuras .....	33
6. Bibliografia.....	34

## **Índice de Tabelas**

<b>Tabela 3.1. Delineamento experimental .....</b>	<b>7</b>
<b>Tabela 4.1. °Brix, pH e acidez titulável nas amostras não tratadas, tratadas ao longo dos vários tempos de conservação.....</b>	<b>15</b>
<b>Tabela 4.2. Valores da cor no espaço L*C*h. ....</b>	<b>21</b>
<b>Tabela 4.3. Teor de polifenóis totais, FRAP, TEAC e ácido ascórbico.....</b>	<b>24</b>
<b>Tabela 4.4. Valores nutricionais obtidos antes e após aplicação do tratamento.....</b>	<b>30</b>
<b>Tabela 4.5. Efeito do tratamento de HPP e do tempo de prateleira na qualidade microbiológica do sumo.....</b>	<b>31</b>



## Índice de Figuras

Figura 3.1. Amostras prontas para serem tratadas por altas pressões hidroestáticas. .....	8
Figura 4.1. pH nas amostras não tratadas por HPP (BNT) e nas amostras tratadas no tempo 0 (BT0) e durante as 4 semanas de armazenamento (BT 1, BT2, BT3 e BT4).....	16
Figura 4.2. °Brix antes da aplicação do tratamento (BNT) e após o tratamento no tempo 0 (BT0) e durante as 4 semanas de armazenamento (BT 1, BT2, BT3 e BT4).....	17
Figura 4.3. Acidez titulável antes da aplicação do tratamento (BNT) e após o tratamento no tempo 0 (BT0) e durante as 4 semanas de armazenamento (BT 1, BT2, BT3 E BT4).....	18
Figura 4.4. Teor da humidade ao longo do ensaio.....	19
Figura 4.5. Valores do teor de cinza antes, depois do tratamento de HPP e depois ao longo do período de conservação. ....	20
Figura 4.6. Brilho L* antes da aplicação do tratamento (BNT) e após o tratamento no tempo 0 (BT0) e durante as 4 semanas de armazenamento (BT 1,BT2,BT3 E BT4. ....	21
Figura 4.7. Saturação (C*) antes da aplicação do tratamento (BNT) e após o tratamento no tempo 0 (BT0) e durante as 4 semanas de armazenamento (BT 1, BT2, BT3 E BT4).....	22
Figura 4.8. Medição da tonalidade (°) antes da aplicação do tratamento (BNT) e após o tratamento no tempo 0 (BT0) e durante as 4 semanas de armazenamento (BT 1,BT2,BT3 E BT4. ....	23
Figura 4.9. Polifenóis totais antes da aplicação do tratamento (BNT) e após o tratamento no tempo 0 (BT0) e durante as 4 semanas de armazenamento (BT 1, BT2, BT3 e BT4). ....	25
Figura 4.10. Avaliação da capacidade antioxidante, antes da aplicação do tratamento (BNT) e após o tratamento no tempo 0 (BT0) e durante as 4 semanas de armazenamento (BT 1,BT2,BT3 E BT4).....	26
Figura 4.11. Avaliação da capacidade antioxidante, antes da aplicação do tratamento (BNT) e após o bn tratamento no tempo 0 (BT0) e durante as 4 semanas de armazenamento (BT 1, BT2, BT3 E BT4).....	28

<b>Figura 4.12. Teor de ácido ascórbico, antes da aplicação do tratamento (BNT) e após o tratamento no tempo 0 (BT0) e durante as 4 semanas de armazenamento (BT 1, BT2, BT3 e BT4 .....</b>	<b>29</b>
--	-----------

## **Lista de Abreviaturas**

FAO - *Food and Agriculture Organization*

HPP - *High Pressure Processing*

PP – Polipropileno

NP - Norma Portuguesa

NaOH - Hidróxido de sódio

FRAP - *Ferric reducing antioxidant power assay*

TEAC - *Trolox equivalent antioxidant capacity assay*

TPTZ- *2,4,6-tripyridyl-s-triazine*

ABTS- *2,20-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt*

2,4-DNPH - *2,4-dinitrophenylhydrazine*

ISO - *International Organization for Standardization*

UFC/g – Unidade formadora de colónias por grama

## **1. Enquadramento e objetivo**

Devido à crescente exigência das populações em consumir produtos saudáveis, naturais, mas igualmente seguros, existe por parte das empresas e comunidade científica a obrigação de procurar e dar respostas a essas exigências. São muitas as técnicas de conservação usadas atualmente no mercado, contudo a procura por novos métodos alternativos, tem sido uma constante. Atualmente, um dos métodos mais usados, são os tratamentos térmicos. Contudo, este tipo de tratamentos tem efeitos secundários na qualidade dos produtos, quer a nível nutricional, quer a nível sensorial, e este tipo de efeitos não é desejável hoje em dia pelos consumidores (Abera, 2019). Nos dias que correm, os consumidores procuram, cada vez mais, produtos frescos, naturais, saudáveis, saborosos, seguros, de alta qualidade, livres de conservantes e aditivos, mas com uma vida útil prolongada (Abera, 2019).

Para acompanhar as exigências e conhecimentos do consumidor, novas tecnologias têm vindo a ser estudadas. A alta pressão hidrostática é uma dessas tecnologias que auxiliam na prevenção dos produtos alimentares. Esta tecnologia é promissora, uma vez que reduz os microrganismos e enzimas, mantendo a qualidade nutricional dos produtos (Abera, 2019).

Assim, esta dissertação de mestrado teve como objetivo estudar os efeitos da aplicação da tecnologia de altas pressões hidrostáticas a um sumo constituído pela mistura de 87% de sumo de romã e 13% de sumo de morango, a nível microbiológico, físico-químico, nutricional, funcional e determinar o tempo de prateleira. Esta dissertação é escrita com base nas normas para a elaboração de documentos institucionais e trabalhos académicos produzidos no instituto politécnico de Beja.

## 2. Introdução

### 2.1. Romã

A romãzeira pertence à família *Punicaceae* (Mphahlele *et al.*, 2016), é originária da Ásia Central, mas existe um pouco por todos os tipos de climas, e os seus frutos são considerados de alto valor nutricional e terapêutico (Hmid *et al.*, 2018; Manthou *et al.*, 2017).

A produção de romã é feita um pouco por todo o mundo, o que faz com que haja uma variação genética muito grande deste tipo de árvore. Atualmente, as maiores áreas de plantação de romã encontram-se na Argentina, Israel, Brasil, Peru Chile e África do sul. Contudo, não se sabe ao certo a área total desta cultura (Geometry & Analysis, n.d.).

Havendo uma grande variação a nível genético, sabe-se que este tipo de árvore pode chegar a atingir uma altura até 9 metros. Estas árvores só começam a ser produtivas, após três anos da sua plantação, mas é ao final de cinco anos que atingem a sua maior rentabilidade. Nos primeiros anos, a produção por árvore pode ser entre 10 a 20 kg, mas nos anos seguinte pode atingir uma produção de 60 a 100 kg por árvore, dependendo sempre da área geográfica onde se encontra instalada (Geometry & Analysis, n.d.).

Em relação à sua morfologia, este fruto é constituído por finas membranas que não são comestíveis e por arilos. Este contém sementes que são benéficas para a saúde (Geometry & Analysis, n.d.). Este fruto tem inúmeras variedades, como por exemplo, “Wonderful”, “Hicaznar”, “Bhagwa”, “Arakta”, “Mollar de Elche”, entre outras. As características morfológicas e as propriedades químicas, como por exemplo, o pH e o °Brix, dependem não só da variedade, mas principalmente do clima onde as romãzeiras estão instaladas (Geometry & Analysis, n.d.).

A nível de produção de sumo, é possível extrair-se da romã entre 20 a 50 % de sumo. Este é composto por 85% de água, 10% de açúcar (glucose, sacarose e frutose), 1.5% de pectina e ácidos orgânicos (ácido ascórbico, cítrico e málico), ácidos gordos, aminoácidos e outros compostos bioativos (Putnik *et al.*, 2018).

Devido à sua composição, este fruto tem elevados benefícios para a saúde dos seus consumidores (Geometry & Analysis, n.d.). Este contém compostos bioativos que

podem ser encontrados na pele, na semente e nos arilos. Devido às suas propriedades, estes compostos são usados em diferentes indústrias, como, por exemplo, a indústria farmacêutica, cosmética e alimentar (Putnik *et al.*, 2018).

Em virtude da evolução do conhecimento das propriedades benéficas que o consumo deste tipo de fruto tem, o seu consumo tem vindo a aumentar, quer sob a forma de fruta fresca, quer sob a forma de sumo. Os vários estudos realizados tanto *in vivo* como *in vitro* demonstraram que o sumo de romã tem efeitos benéficos na atividade antibacteriana, anti-inflamatória, antiviral e anticancerígena (Geometry & Analysis, n.d.).

Os conhecimentos acerca deste produto têm sido cada vez mais aprofundados e as conclusões alcançadas tiveram um impacto enorme no consumo do mesmo, o que fez com que a produção e a exportação de romã aumentassem. Atualmente, os principais exportadores são Índia, Irão, China, Turquia, Estados Unidos, Espanha, África do Sul, Peru, Chile e Argentina.

## **2.2. Morango**

O morango é um dos frutos mais consumidos mundialmente devido ao seu sabor doce (Šamec *et al.*, 2016), à sua cor atraente e ao seu bom aroma.. Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO), em 2016, este fruto teve uma produção anual de 9 milhões de toneladas (Aaby *et al.*, 2018). Esta fruta é constituída por compostos antioxidantes naturais (Cao *et al.*, 2012). É rico em polifenóis e um dos seus aspetos mais interessantes a nível funcional é o seu elevado conteúdo de vitamina C (Aaby *et al.*, 2018; Šamec *et al.*, 2016). Tal como acontece com a romã, este fruto tem vários benefícios para a saúde. O consumo desta fruta ajuda na prevenção de várias doenças, como inflamações, doenças cardiovasculares, obesidade, certos tipos de cancro e doenças neurológicas. Estas propriedades são devidas ao seu alto teor em antocianinas e compostos polifenólicos (Aaby *et al.*, 2018; Cao *et al.*, 2012; Šamec *et al.*, 2016). As antocianinas são também responsáveis pela cor deste fruto (Šamec *et al.*, 2016).

Este fruto é muito consumido em fresco, mas também é muito usado em compotas, sumos, conservas enlatadas, fruta cristalizada e iogurtes (Cao *et al.*, 2012).

## 2.3. Métodos térmicos e não térmicos

Todos os tratamentos usados hoje em dia na indústria são aplicados com o intuito de obter alimentos seguros para o consumo humano. Contudo, nem todos os tratamentos têm um impacto positivo a nível nutricional e sensorial do produto.

Devido à exigência do consumidor na procura de produtos seguros, mas igualmente interessantes nutricionalmente e naturais, o interesse por técnicas alternativas é cada vez maior. Assim, o grande desafio para a utilização deste tipo de tratamentos é superar todos os impactos negativos dos tratamentos comuns, mas garantir que o produto seja igualmente seguro sem risco para a saúde pública.

Um dos métodos térmicos mais usados na indústria alimentar é a pasteurização. Este tratamento devido ao facto de ser um tratamento térmico, em que se aplica temperaturas elevadas, tem impactos negativos a nível da qualidade nutricional e sensorial do produto (Putnik *et al.*, 2018).

Hoje em dia, já existem tecnologias alternativas aos tratamentos térmicos, como por exemplo a radiação ultravioleta, as altas pressões hidrostáticas, os campos elétricos pulsados e os ultrassons (Putnik *et al.*, 2018).

O processo de tratamento por radiação ultravioleta pode reduzir a carga bacteriana em alimentos e bebidas, sem retirar impacto negativo na qualidade do produto. Durante o tratamento, o DNA das células microbianas absorve a luz e é degradado (Putnik *et al.*, 2018).

O tratamento por ultrassons é também muito usado na indústria alimentar. Este método é usado tanto no processamento, na conservação, como na extração. Este tipo de tratamento aumenta a vida útil do produto sem comprometer as qualidades nutricionais e sensoriais do mesmo (Putnik *et al.*, 2018).

O processamento por campos elétricos pulsados tem vindo a ganhar visibilidade. Este tipo de tratamento é usado como pré-tratamento, que em combinação com certas operações mecânicas, aumenta o rendimento, sem colocar em risco as características sensoriais do produto. Os microrganismos são inativados devido à diferença de

potencial. Esta diferença de potencial vai fazer com que a parede celular dos microrganismos seja destruída levando assim à sua inativação (Putnik *et al.*, 2018).

Outro método não térmico é o tratamento por altas pressões hidrostáticas. Este método opera a temperatura ambiente ou moderada e a pressões entre a 100 a 1000 MPa. Aumenta a vida útil dos produtos sem ser necessário aditivos e tem impactos mínimo a nível sensorial, nutricional e físico-químico (Abera, 2019; Putnik *et al.*, 2018).

## **2.4. Tratamento de altas pressões hidrostáticas**

A alta pressão hidrostáticas (HPP) é uma tecnologia não térmica. Esta faz com que a vida útil dos produtos seja aumentada com a inativação dos microrganismos e desnaturação das enzimas, mas sem colocar em causa as suas propriedades organoléticas e nutricionais do produto (Abera, 2019; Gopal, 2018; Wael M. Elamin *et al.*, 2015).

Este tratamento baseia-se em dois princípios. O princípio de Le Chatelier, que nos diz que fenómenos que resultam numa diminuição de volume, tais como transições de fase, reações químicas ou a alterações da configuração molecular, são acelerados pela pressão; pelo contrário, fenómenos que resultam num aumento de volume, são desacelerados pela pressão. E pelo princípio isostático, que diz que a pressão aplicada é transmitida instantaneamente e uniformemente por toda a amostra, independentemente da seu tamanho e forma (Abera, 2019).

Foi Certes, em 1883 o primeiro a relatar os efeitos que este tipo de tratamento tinha sobre os organismos. Contudo, foi em 1899, no final do século XIX, que os efeitos das altas pressões hidrostáticas foram revelados por Bert Hite, em colaboração com a estação de investigação da área agrícola da universidade do estado da Virgínia. Este usou um de tratamento até 600 MPa para a preservação de leite em 1914; posteriormente começou-se aplicar em frutas e vegetais (Wael *et al.*, 2015).

Só 100 anos após a primeira descoberta da inativação dos microrganismos é que este tipo de tratamento voltou a ganhar importância, e foi em 1990 no Japão que foi desenvolvido o primeiro equipamento de alta pressão hidrostática. Em 1992 foi colocado no mercado o primeiro alimento tratado por esta técnica, sendo hoje em dia vários os produtos que se podem encontrar no mercado (Wael *et al.*, 2015).



Uma das vantagens do tratamento por HPP é este ser aplicado já com o produto embalado, ou seja, após aplicação do tratamento já não há manuseamento humano que possa colocar em causa a eficiência do processo aplicado. Esta técnica de inativação de microrganismos e enzimas faz com que a validade dos produtos seja maior e, ao mesmo tempo, são minimizados os efeitos negativos provocados por outros tipos de tratamentos, tanto a nível nutricional como sensorial. Pensa-se que a principal razão pela qual esta técnica inativa os microrganismos é devida à rutura celular dos mesmos (Wael *et al*, 2015).

Hoje em dia, já são vários os estudos existentes que comprovam a eficácia deste tipo de tratamento em comparação com outro tipo de tratamentos convencionais, tanto a nível microbiológico, como a nível sensorial, nutricional e químico (Abera, 2019).

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1. Delineamento experimental

Com a realização deste trabalho, pretendeu-se avaliar o efeito das altas pressões hidrostáticas sobre o sumo de romã e morango, bem como o seu comportamento ao longo de quatro semanas a uma temperatura de  $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

O sumo constituído por 87% de romã e 13% de morango foi embalado em sacos de polipropileno (PP) com um volume aproximadamente de 100 mL, tal como se descreve à frente na secção 3.2. Onze réplicas (onze sacos de sumo) não foram submetidas a tratamento de HPP; quarenta e três réplicas foram submetidas ao tratamento de HPP. Os sumos foram analisados quanto a características microbiológicas, físico-químicas, e funcionais nos seguintes momentos: antes do tratamento (BNT, réplicas não tratadas), imediatamente após o tratamento (BT0, tempo zero), e ainda a intervalos de uma semana, durante quatro semanas (BT1, BT2, BT3 e BT4, bebida tratada após, respetivamente, a primeira, segunda, terceira e quarta semanas). Para a caracterização microbiológicas utilizou-se duas amostras compostas, sendo as características físico-químicas e funcionais analisadas a partir de três réplicas em cada um dos tempos.

O valor nutricional foi determinado em três réplicas não tratadas (BNT) e em três réplicas imediatamente após o tratamento (BT0).

A Tabela 3.1 resume o delineamento experimental.

**Tabela 3.1. Delineamento experimental**

<b>Siglas</b>	<b>Denominações</b>
<b>BNT</b>	Bebida não tratada
<b>BT0</b>	Bebida tratada - logo após aplicação do tratamento
<b>BT1</b>	Bebida tratada – após uma semana de conservação
<b>BT2</b>	Bebida tratada – após duas semanas de conservação
<b>BT3</b>	Bebida tratada – após três semanas de conservação
<b>BT4</b>	Bebida tratada – após quatro semanas de conservação

### **3.2. Extração do sumo**

Foram usados 13 kg de sumo de romã da variedade “Mollar de Elche” e 2 kg de morangos da variedade “Albion”. Nesta formulação foi usado morango com o intuito de dar corpo ao sumo de romã. Os arilos da romã foram retirados manualmente. Após a extração dos arilos, estes foram triturados com o auxílio de uma farinha mágica e filtrados. Os morangos foram lavados e foram adicionados ao sumo de romã para ser triturado em simultâneo. O sumo foi cheio e embalado na máquina de embalagem vertical, utilizando sacos de PP.

A extração e elaboração do sumo foram realizadas nas instalações da empresa Vasco, Nuno & Cláudio Vieira, Lda.

### **3.3. Tratamento de altas pressões hidrostáticas**

O tratamento foi realizado no Instituto Tecnológico Agroalimentario da Extremadura (INTAEX). Para o mesmo foi utilizado uma unidade semi-industrial (Hiperbaric Wave 6000/55, Hiperbaric, S.A., Burgos, Espanha). O tratamento foi feito durante 480 s, a uma pressão de 600 MPa e a uma temperatura de 10 °C.

Os sacos foram colocados nos vasos como se pode verificar na fotografia da Figura 3.1, e introduzidos no interior do equipamento para se proceder ao tratamento.



**Figura 3.1. Amostras prontas para serem tratadas por altas pressões hidrostáticas.**

### **3.4. Caracterização físico-química**

Todas as determinações referidas abaixo foram efetuadas no mínimo em triplicado.

#### **3.4.1. Resíduo seco solúvel**

Para a medição do teor de resíduo seco solúvel, expresso em °Brix, foi usado o refratômetro digital portátil Bellingham & Stanley, modelo DR 103L.

#### **3.4.2. pH**

A determinação do pH foi efetuada utilizando o medidor de pH Metrohm modelo 691 (Suíça), e um eletrodo de vidro devidamente calibrado.

#### **3.4.3. Acidez titulável total**

A determinação da acidez titulável total foi efetuada seguindo a norma portuguesa NP 1421 (1977). Diluiu-se 5 mL das amostras em 25 mL de água purificada e titulou-se potenciometricamente com solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) 0,10 N padronizada, considerando-se o ponto final da titulação o valor de pH de 8,1. O resultado final foi expresso em gramas de ácido cítrico mono-hidratado por 100 mL de sumo.

#### **3.4.4. Humidade**

O teor de humidade foi determinado de acordo com o método AOAC 920.151. (AOAC, 1998). Pesou-se para uma cápsula 10 g de sumo, que se espalhou numa fina camada na cápsula, secando-se a 70 °C sob pressão < 100 mm Hg (13,3 kPa) em estufa de vácuo Binder (modelo VD 53), até que duas pesagens consecutivas feitas a intervalos de duas horas tivessem uma variação igual ou inferior a 3 mg.

#### **3.4.5. Cinza**

Procedeu-se de acordo com o método AOAC 940.26, com ligeiras modificações. Uma toma de aproximadamente 10 g de sumo foi pesada para uma cápsula e previamente sujeita a evaporação da respetiva água em estufa. Em seguida foi incinerada a cerca 525 °C até obtenção de cinza branca. A cinza foi humidificada e re-incinerada até peso constante.

### 3.4.6. Cor por colorímetro

A medição da cor foi efetuada por reflectância utilizando o Colorímetro Minolta CR-300® (Minolta, Japão). O aparelho foi previamente calibrado com o padrão que o acompanha ( $Y = 92,7$ ;  $x = 0,3134$ ;  $y = 0,3195$ ), e como fonte de luz utilizou-se o iluminante C. As medições foram feitas em triplicado nas coordenadas do espaço CIE  $L^*a^*b^*$ . Posteriormente os valores destas coordenadas rectangulares foram convertidas nas coordenadas cilíndricas do espaço de cor  $L^*C^*h^*$ , pela maior sua maior conveniência neste trabalho.  $L^*$  representa a luminosidade ou brilho,  $C^*$  a saturação ou pureza da cor e  $h^*$  a tonalidade ou matiz. A tonalidade neste espaço corresponde a um ângulo que varia entre  $0^\circ$  e  $360^\circ$ ;  $0^\circ$  corresponde a uma tonalidade vermelha, que passa a amarela quando  $h^* = 90^\circ$ , verde quando  $h^* = 180^\circ$ , e azul quando  $h^* = 270^\circ$ .

## 3.5. Caraterização funcional

O teor de fenóis totais, a atividade antioxidante avaliada pelos métodos FRAP (*Ferric reducing antioxidant power assay*) e TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity assay*), assim como o teor de ácido ascórbico foram determinados utilizando, com pequenas adaptações, os métodos descritos por Müller *et al.* (2010). Estas determinações foram efetuadas utilizando os extratos das amostras de sumo obtidos como a seguir se descreve, em microplaca de fundo plano transparente de 96 poços (Greiner), sendo as absorvências medidas num leitor de microplacas Fluostar Optima, BMG Labtech, e feitas no mínimo em triplicado.

### 3.5.1. Procedimento para a obtenção dos extratos

A obtenção dos extratos para a determinação do teor de fenóis e da atividade antioxidante foi efetuada de acordo com o procedimento descrito por Toor *et al.* (2004) modificado. Um volume de 0,5 mL de sumo homogeneizado foi misturado com 1,5 mL de acetona:água:ácido acético (70,0:29,5:0,5; v/v) num micro-tubo e a mistura agitada num termobloco de agitação Bioer (modelo MB 102) a 1500 rotações por minuto durante 10 minutos e em seguida centrifugado a 16000 g durante 15 minutos numa micro-centrífuga Hettich modelo MiKro 200; o sobrenadante foi então decantado para um balão volumétrico de 10 mL; o resíduo voltou a ser extraído por mais três vezes seguindo este procedimento. No final o balão foi completado ao volume com a mistura acetona:água:ácido acético.

Para a obtenção do extrato para a determinação do ácido ascórbico procedeu-se como acima descrito, tendo-se utilizado como solvente ácido *meta*-fosfórico (4,5 g/100 mL).

### 3.5.2. Teor de fenóis totais

O teor total de fenóis foi avaliado utilizando o método de Folin-Ciocalteu. 20 µL de extrato diluído de modo a absorvência se situar dentro da curva de calibração, foram misturados com 100 µL de reagente de Folin-Ciocalteu diluído a 1:10 e 75 µL de carbonato de sódio (75 g/L) num poço da microplaca. Após duas horas no escuro à temperatura ambiente, a absorvência foi medida a 740 nm no leitor de microplacas. Ácido gálico mono-hidratado (1,05-21,0 mg/100 mL) foi utilizado como padrão para a construção de uma linha de regressão linear tendo-se utilizado a solução acetona:água:ácido acético como branco.

### 3.5.3. FRAP

O ensaio FRAP mede o potencial redutor dos antioxidantes. 20 µL de extrato devidamente diluído para a absorvência se situar dentro da curva de calibração, foram misturados com 30 microlitros de água num poço de uma microplaca. Adicionou-se 200 µL do reagente FRAP preparado diariamente, consistindo este em 10 volumes de 300 mmol/L de tampão de acetato (pH 3,6), 10 volumes de FeCl<sub>3</sub> a 20 mmol/L, um volume de 2,4,6-tripiridyl-*s*-triazine (TPTZ) diluído em ácido clorídrico a 40 mmol/L, o complexo TPTZ férrico é reduzido à sua forma ferro (II) pelos antioxidantes. Utilizou-se como branco a solução acetona:água:ácido acético. Soluções de sulfato ferroso com concentração entre 0,25 e 2,5 mmol/L. O valor de FRAP foi calculado pela construção de uma linha de regressão e expresso em mmol Fe<sup>2+</sup>/100 mL de amostra.

### 3.5.4. TEAC

O ensaio TEAC foi levado a cabo utilizando o radical catiónico estável ABTS<sup>•+</sup>. Este foi gerado misturando 10 mL de solução de 2,20-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS) com 10 mL de solução de peroxodissulfato de potássio a 2,45 mmol/L. Depois de 24 horas no escuro à temperatura ambiente, esta solução de *stock* ficou pronta para ser utilizada. Uma solução de trabalho foi preparada diariamente diluindo a solução *stock* de ABTS<sup>•+</sup> com tampão fosfato (75 mmol/L, pH 7,4) a uma absorvência de 0,70 ± 0,05 a 730 nm. 20 µL de extrato devidamente diluído

(de modo as respectivas absorvências se situarem dentro da gama das absorvências da curva de calibração) foram misturados com 200 µL da solução de trabalho de ABTS<sup>•+</sup> num poço de microplaca. Como curva de calibração, uma linha de regressão linear foi construída entre a concentração de soluções de Trolox (12,5-250 µL/mL), utilizando-se como branco a solução acetona:água:ácido acético. A capacidade antioxidante das amostras foi expressa como equivalentes Trolox (TE) em mmol/100 g.

### **3.5.5. Ácido ascórbico**

O ensaio para a determinação do ácido ascórbico utilizado baseia-se na reação do ácido desidro-ascórbico com o *2,4-dinitrophenylhydrazine* (2,4-DNPH). Para a determinação do ácido ascórbico, 300 µL de extrato, devidamente diluído, foram misturados com 450 µL de ácido tricloroacético (5 g/100 mL). Depois de centrifugação (5 minutos a 16 000 g), 450 µL da camada líquida foram misturados com o chamado reagente DNP, obtido pela mistura de um volume de tioureia (5 g/100 mL), um volume de sulfato de cobre II (0,6 g/ 100 mL) e 20 volumes de 2,4-DNPH (22 mg/mL em ácido sulfúrico a 4,5 mol/L). Esta mistura foi aquecida e agitada uma hora (60 °C a 500 rpm) em termobloco. Depois de arrefecido durante 5 minutos em gelo, foram adicionados 600 µL de ácido sulfúrico (90 g/100 mL). A mistura foi mantida no escuro durante 20 minutos à temperatura ambiente. Para a medição da absorvência a 510 nm no leitor de microplacas, foram pipetados 200 µL para um poço de microplaca. Foi determinada uma linha de regressão linear entre a concentração de soluções padrão de ácido ascórbico (1-50 µL/mL) e as respectivas absorvências a 510 nm, utilizando-se como branco, solução de ácido *meta*-fosfórico.

### **3.6. Caracterização microbiológica**

Na caracterização microbiológica foram feitas as seguintes análises: contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos a 30°C, psicrofílos, coliformes, bolores e leveduras.

Para a realização das mesmas foram usados os seguintes protocolos: para a contagem de aeróbios mesófilos a 30°C: NP 4405/2002 Microbiologia Alimentar, Regras gerais para a contagem de microrganismos e Contagem de colónias a 30°C; para os psicrofílos: NP 4405/2002 Microbiologia Alimentar. A incubação foi feita a 4°C; para coliformes: ISO 4832:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for

the enumeration of coliforms — Colony-count technique; e para os Bolores e leveduras: NP 3277-1: 1987 (1987) Microbiologia Alimentar – Contagem de bolores e leveduras. Após o tratamento as amostras foram transportadas em caixas térmicas e foram armazenadas a  $3^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante quatro semanas.

### **3.6.1. Microrganismos aeróbios mesófilos a 30 °C e psicrófilos**

Para a elaboração da contagem de microrganismos a 30 °C, realizou-se a técnica de incorporação, em que se pipetou 1 mL para cada diluição utilizada. Esta foi colocada em caixa de petri esterilizada. Posteriormente incorporou-se com o meio PCA. Efetuou-se movimentos circulares para se homogeneizar. A incubação foi feita a 30 °C durante 48 a 72 horas.

Para os psicrófilos o procedimento foi igual. Após aplicação dos procedimentos estes foram incubados a 4 °C durante 5 a 7 dias.

### **3.6.2. Bolores e Leveduras**

Para a pesquisa de bolores e leveduras foi utilizado o meio de cultura de Rose Bengal agar. A partir da diluição  $10^{-1}$  foi distribuído 1 mL por três placas. Posteriormente foi utilizado um espalhador esterilizado e aplicou-se a técnica de espalhamento. Após este procedimento, as placas foram a incubar a 22°C durante 5 dias.

A contagem microbiológica expressa-se em unidades formadores de colônia por grama (UFC/g).

### **3.6.3. Coliformes totais**

Para a pesquisa de coliformes totais, pipetou-se 1 mL da diluição de  $10^{-1}$  para as restantes diluições. Após aplicação do 1 mL foi colocado o meio VRBL e agitou-se a placa em círculos. Após a primeira camada se encontrar solidificada foi adicionada a segunda camada. As placas foram incubadas a 30°C durante 24 horas. A contagem é expressa em UFC/g.

## **3.7. Avaliação Nutricional**

A avaliação nutricional foi realizada de acordo com o Regulamento (UE) n.º 1169/2011 em laboratório externo certificado. Determinou-se o valor energético, teor de matéria



gorda, ácidos gordos saturados, hidratos de carbono, açúcares, proteína, fibra alimentar e sal.

### **3.8. Tratamento dos dados**

Os dados foram tratados utilizando o programa Statistica 12 (StatSoft®, 2013), efetuando-se a análise de variância *one-way ANOVA* para um nível de significância de 0,05 e o teste de Tukey para comparação de médias.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Caracterização físico-química

#### 4.1.1. Teor de sólidos solúveis (°Brix), pH, acidez titulável

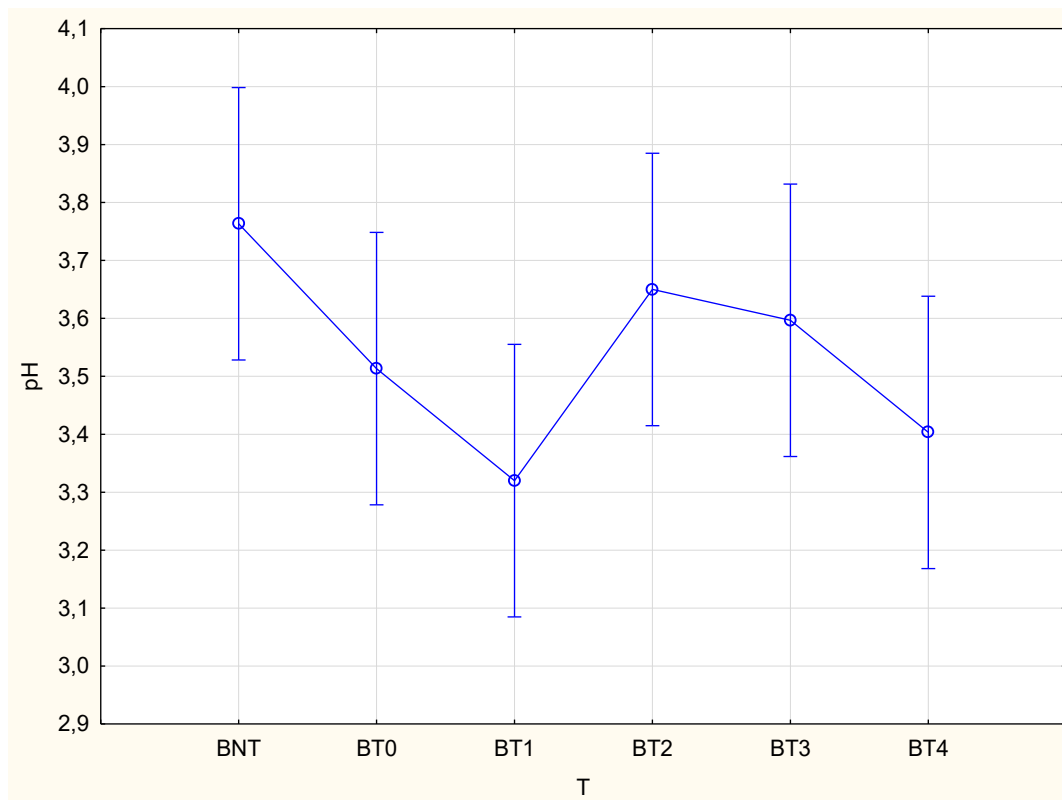
Na Tabela 4.1 estão representados os valores relativos ao °Brix, pH e acidez titulável. Para uma melhor visualização do comportamento destes parâmetros com o tratamento e durante o tempo de conservação em estudo, apresentam-se mais à frente em gráfico (o círculo indica a média e a barra, o intervalo de confiança a 95%).

**Tabela 4.1.** °Brix, pH e acidez titulável nas amostras não tratadas, tratadas ao longo dos vários tempos de conservação (média  $\pm$  DP,  $n \geq 3$ ). Índices diferentes na mesma coluna, traduzem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Amostras	°Brix	pH	Acidez titulável* (g/100 mL)	Humidade (%, m/m)	Cinza (%, m/m)
BNT	11,7 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	3,76 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	0,50 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	87,5 $\pm$ 1,09 <sup>a</sup>	0,38 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
BT <sub>0</sub>	11,5 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	3,51 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	0,43 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup>	87,97 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	0,40 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
BT <sub>1</sub>	11,7 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	3,32 $\pm$ 00 <sup>a</sup>	0,36 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	87,63 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	0,50 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>
BT <sub>2</sub>	11,3 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	3,65 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,38 $\pm$ 0,04 <sup>ab</sup>	88,28 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>	0,41 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>
BT <sub>3</sub>	10,9 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	3,6 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>	0,37 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup>	88,63 $\pm$ 0,63 <sup>a</sup>	0,47 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>
BT <sub>4</sub>	11,2 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	3,4 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	0,39 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>	88,16 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,39 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>

\* Expressa em ácido cítrico mono-hidratado.

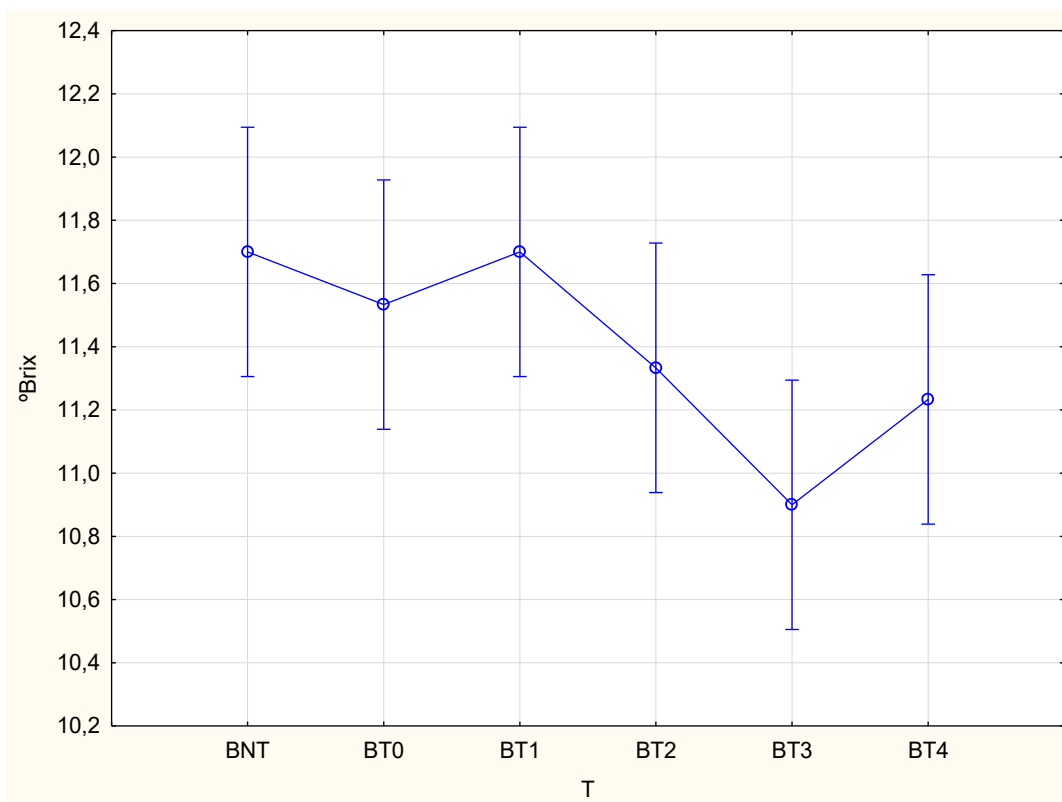
Comparando os valores de pH do sumo antes do tratamento por altas pressões hidrostáticas e imediatamente após, assim como ao longo do tempo do estudo (4 semanas), (Figura 4.1), verificou-se não ter havido diferenças significativas naqueles valores ( $p > 0,05$ ). Este comportamento verificou-se também num estudo realizado para observar os efeitos que o tratamento por HPP tem nas propriedades físico químicas nos compostos bioativos durante a vida útil do sumo de romã (350-550 MPa durante 30, 90 e 150 s)(Varela-Santos *et al.*, 2012).



**Figura 4.1. pH nas amostras não tratadas por HPP (BNT) e nas amostras tratadas no tempo 0 (BT0) e durante as 4 semanas de armazenamento (BT 1, BT2, BT3 e BT4).**

Pode assim concluir-se que nem o tratamento por HPP nem a conservação refrigerada a  $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  ao longo de 4 semanas tiveram influência no pH do sumo.

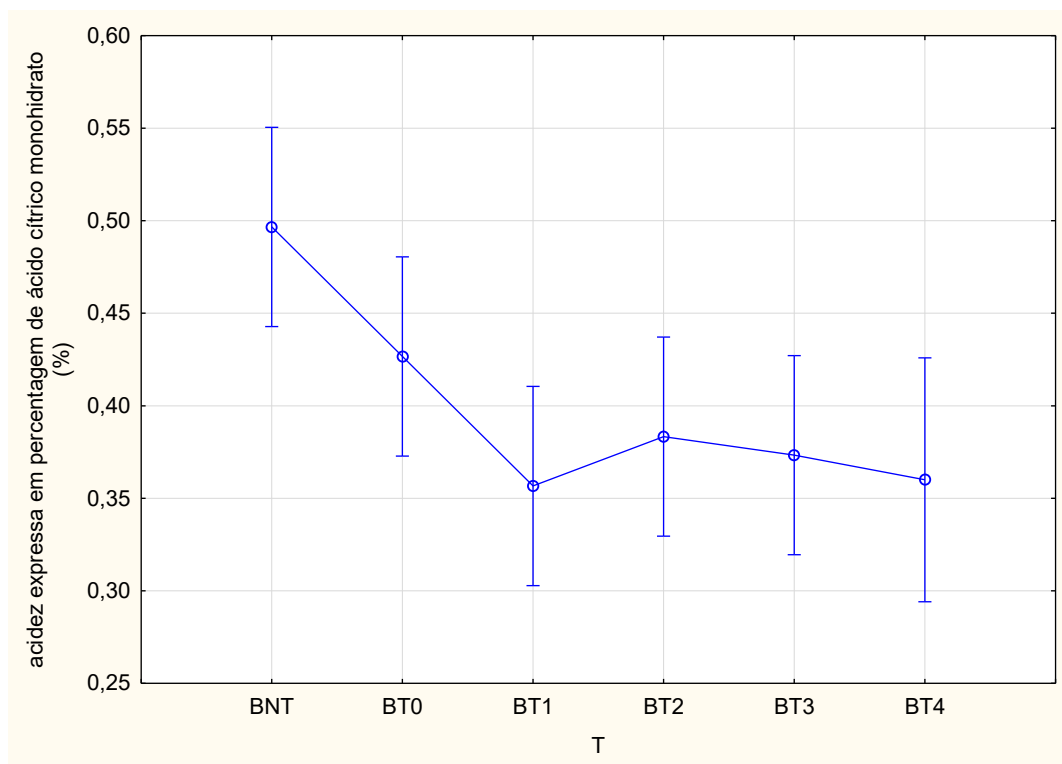
Em relação ao °Brix, apesar de alguma variabilidade (Figura 4.2), à semelhança do que aconteceu com o pH, os valores obtidos também não sofreram alterações significativas ( $p > 0,05$ ). Assim podemos afirmar que nem o tratamento por HPP, nem o seu armazenamento a  $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  tiveram influencia nestes dois parâmetros (pH e °Brix).



**Figura 4.2.** °Brix antes da aplicação do tratamento (BNT) e após o tratamento no tempo 0 (BT0) e durante as 4 semanas de armazenamento (BT 1, BT2, BT3 e BT4).

Em relação aos valores que foram obtidos para acidez titulável, como se pode ver pelo gráfico da Figura 4.3, antes da aplicação do tratamento (BNT) e logo após o tratamento no tempo 0 (BT0) houve uma diminuição acentuada da percentagem de acidez que se estendeu até a primeira semana de armazenamento. Durante as últimas duas semanas de armazenamento (BT2, BT3 e BT4) a percentagem de acidez manteve-se constante.

Segundo vários autores, os indicadores de qualidade variam mais com a variedade da romã e com o seu estado de maturação do que propriamente com aplicação do tratamento (Putnik *et al.*, 2018; Varela-Santos *et al.*, 2012).



**Figura 4.3.** Acidez titulável antes da aplicação do tratamento (BNT) e após o tratamento no tempo 0 (BT0) e durante as 4 semanas de armazenamento (BT 1, BT2, BT3 e BT4).

Segundo um estudo realizado ao puré de morango onde foi usado o tratamento por altas pressões hidrostáticas, também não se verificaram alterações significativas logo após aplicação do tratamento, nem durante as primeiras quatro semanas de armazenamento (Yuan *et al.*, 2018). Num estudo onde foi usado o processo por altas pressões hidrostáticas (400-600 MPa, 20°C, 1,5 a 3 min) e tratamento térmico (85°C, 2min), comparando os efeitos que estes dois tratamentos tiveram tanto em puré de morango como em sumo de morango verificaram que com aplicação do tratamento por HPP não causou alterações no valor de pH nem após a sua aplicação nem durante o seu período de armazenamento a 4°C. Contudo há autores que defendem que quando existe um declínio no pH é devido a migração gradual de ácidos orgânicos provenientes da matriz intracelular das células vegetais que podem ser rompidas durante o tratamento de HPP (Aaby *et al.*, 2018).

Outros autores que realizaram o tratamento em diferentes condições de pressão e de tempo e não observaram diferenças significativas para nos parâmetros de pH, °Brix e acidez titulável (Subasi & Alpas, 2017).

### 4.1.2. Humidade

Como se pode observar pelo gráfico da Figura 4.4 existe uma tendência para o aumento da humidade, e apesar de algumas oscilações, basicamente este parâmetro pouco variou, não sendo essas diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ).

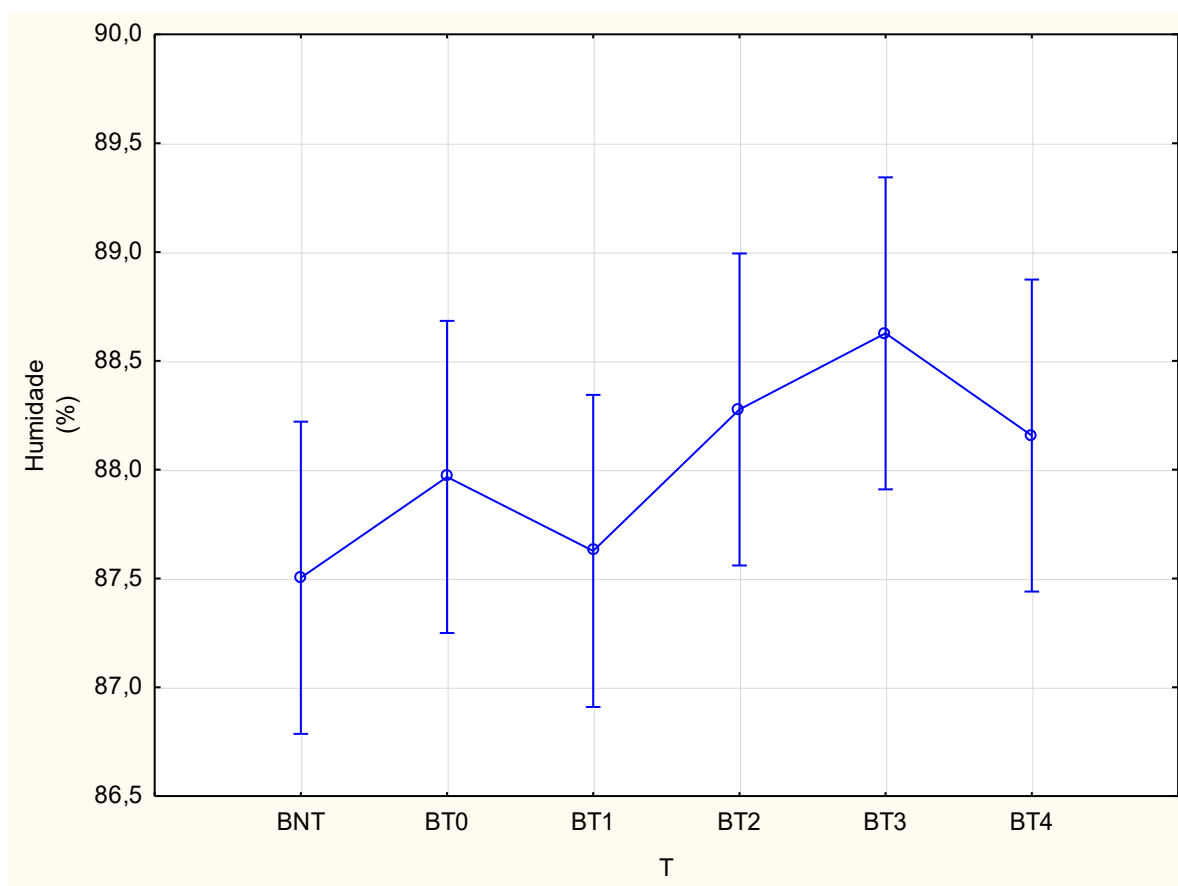
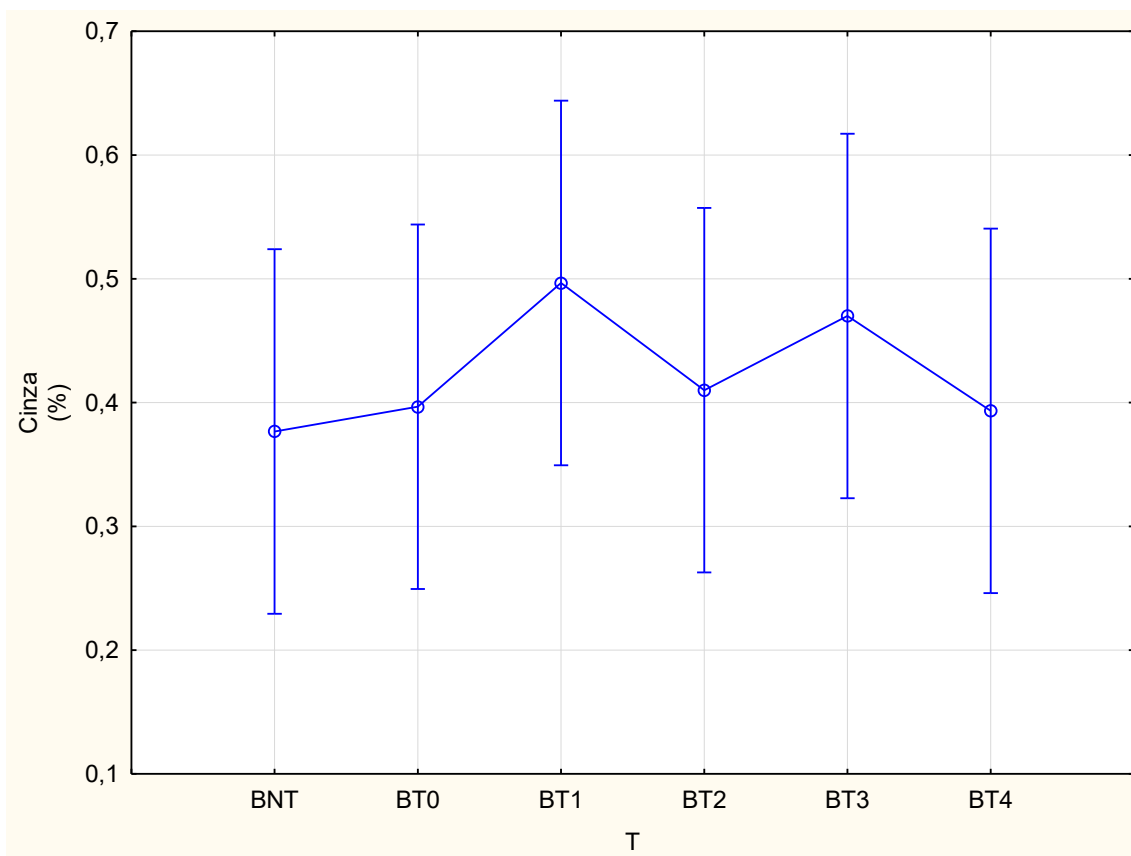


Figura 4.4. Teor da humidade ao longo do ensaio.

### 4.1.3. Cinza

Em relação à percentagem da cinza apresentada na Figura 4.5 também não obteve diferenças significativas antes e após aplicação do tratamento nem durante o seu tempo de armazenamento ( $p > 0,05$ ).



**Figura 4.5.** Valores do teor de cinza antes, depois do tratamento de HPP e depois ao longo do período de conservação.

#### 4.1.4. Cor

Na Tabela 4.2 estão apresentados os valores relativos à cor no espaço  $L^*C^*h^*$ .

Após aplicação do tratamento os valores do brilho aumentaram, mas ao longo do ensaio, estes foram diminuindo gradualmente. Contudo, na terceira e quarta semana de armazenamento não houve alterações significativas ( $p < 0,05$ ).

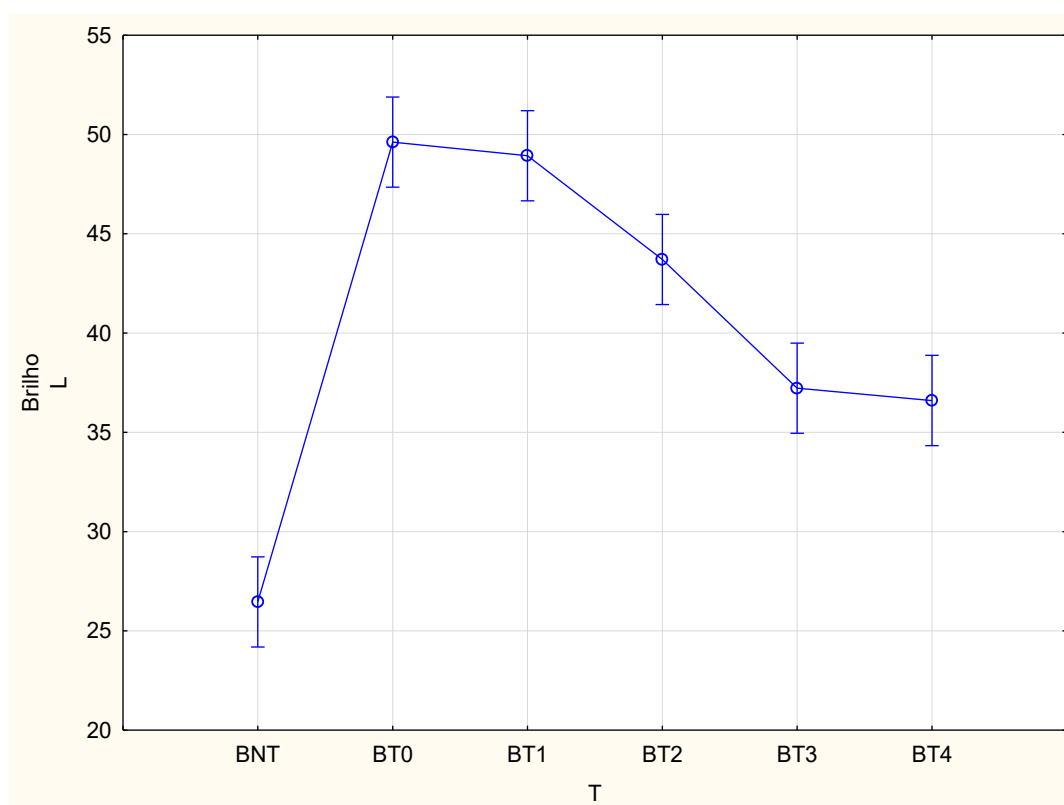
Em relação aos valores obtidos para a saturação  $C^*$ , verificou-se um comportamento idêntico ao que ocorreu com o brilho ( $L^*$ ).

Para a tonalidade, os valores obtidos após o tratamento diminuíram e ao longo do armazenamento tenderam a subir um pouco. Este comportamento está esquematizado no gráfico da Figura 4.6.

**Tabela 4.2. Valores da cor no espaço L\*C\*h\* (média  $\pm$  DP,  $n \geq 3$ ). Índices diferentes na mesma coluna, traduzem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).**

Amostras	Brilho L*	Saturação C*	Tonalidade (°)
<b>BNT</b>	$26,5 \pm 2,89^a$	$23,0 \pm 1,88^a$	$37,8 \pm 1,68^c$
<b>BT0</b>	$49,6 \pm 1,49^d$	$34,9 \pm 1,60^c$	$15,6 \pm 1,09^b$
<b>BT1</b>	$48,9 \pm 2,38^d$	$35,7 \pm 2,38^c$	$11,6 \pm 1,09^a$
<b>BT2</b>	$43,7 \pm 0,68^c$	$27,1 \pm 1,75^{ab}$	$11,7 \pm 1,26^a$
<b>BT3</b>	$37,2 \pm 1,19^b$	$27,9 \pm 0,80^b$	$20,1 \pm 1,61^c$
<b>BT4</b>	$36,6 \pm 1,20^b$	$27,9 \pm 0,65^b$	$24,2 \pm 0,54^d$

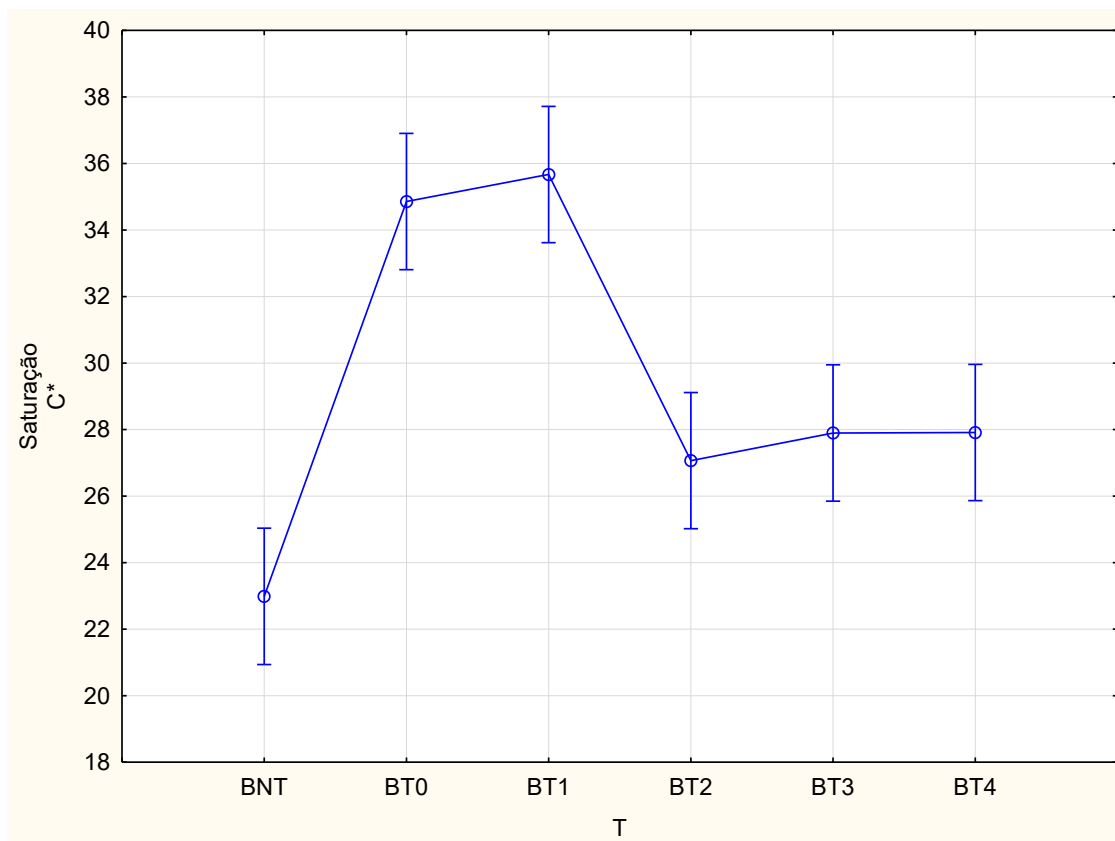
Ao analisar o gráfico da Figura 4.6, pode-se concluir que o tratamento de HPP aumentou o brilho do sumo em estudo. Contudo, ao longo do armazenamento a  $3^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  o brilho teve tendência a diminuir.



**Figura 4.6. Brilho L\* antes da aplicação do tratamento (BNT) e após o tratamento no tempo 0 (BT0) e durante as 4 semanas de armazenamento (BT 1, BT2, BT3 e BT4).**



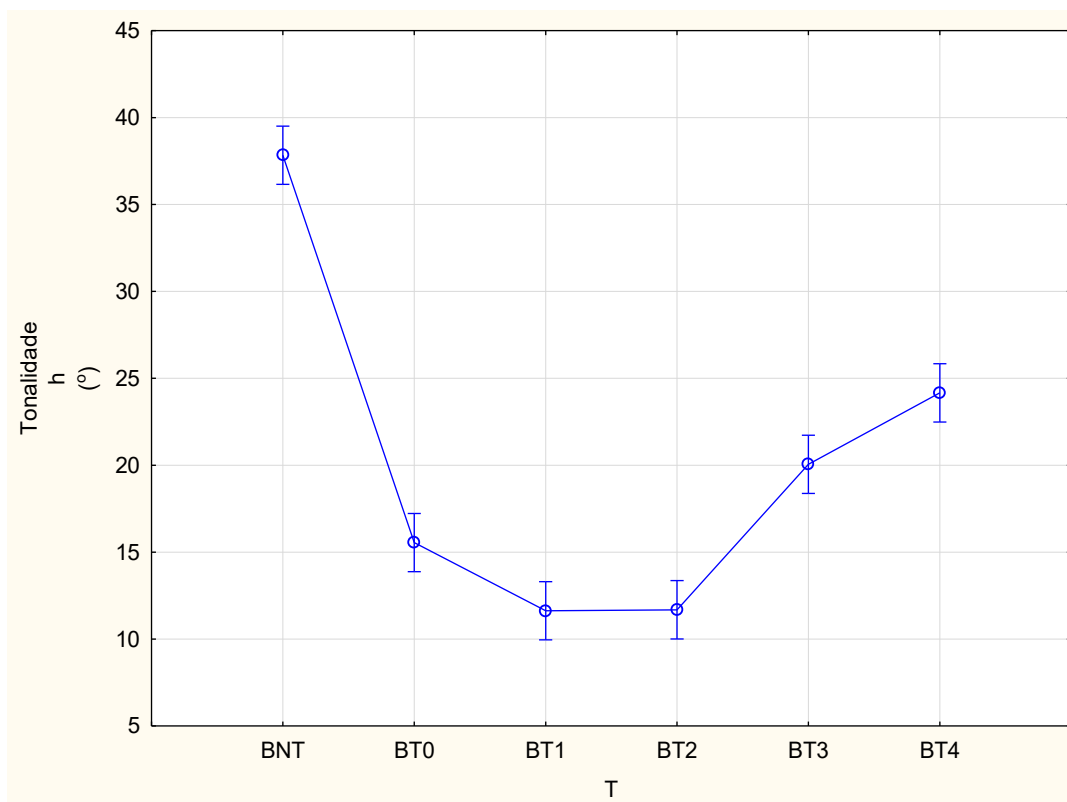
Pelo gráfico da Figura 4.7, podemos concluir que o tratamento de HPP induziu um aumento intenso da saturação ou pureza da cor, que traduz a vivacidade da mesma, mas com o passar do tempo essa saturação voltou a aproximar-se dos valores iniciais.



**Figura 4.7. Saturação (C\*) antes da aplicação do tratamento (BNT) e apos o tratamento no tempo 0 (BT0) e durante as 4 semanas de armazenamento (BT 1, BT2, BT3 e BT4).**

Logo após aplicação do tratamento (BT0), a cor desviou-se abruptamente em direção a tonalidades mais acentuadamente vermelhas, embora durante o período de conservação essa tonalidade se tenha desviado novamente, de modo ligeiro mas significativo, em direção ao amarelo, ou seja para tons mais laranja (Figura 4.8).

Considerando os resultados das três coordenadas ( $L^*C^*h^*$ ), verifica-se que o tratamento de HPP provocou um aumento do brilho, da saturação e da tonalidade vermelha. Mas durante o armazenamento, houve uma tendência para esses atributos voltarem aos valores iniciais. Essa tendência foi mais acentuada no brilho e saturação.



**Figura 4.8. Medição da tonalidade (°) antes da aplicação do tratamento (BNT) e apos o tratamento no tempo 0 (BT0) e durante as 4 semanas de armazenamento (BT1, BT2,BT3 e BT4).**

Alguns autores apontam que esta diferença da cor no sumo de romã poderá ser resultado da presença de enzimas e microrganismos que, juntamente com a presença de oxigênio, dão origem a reações enzimáticas que não são desejadas (Hadidi *et al.*, 2014; Putnik *et al.*, 2018).

O parâmetro cor, para alguns autores, defendem que este não depende do tipo de tratamento aplicado, por exemplo, foram feitos estudos a temperatura ambiente e com pressão entre 350 e 550 MPa e não se verificou alterações nos parâmetros da cor (Gopal, 2018).

Contudo, as investigações que têm sido feitas em relação ao efeito que este tipo de tratamento tem na cor não são unânimes. Alguns defendem que sofre alterações durante o armazenamento, outros defendem que essa diferença é mínima (Varela-Santos *et al.*, 2012).

## 4.2. Caracterização funcional

Na Tabela 4.3 estão apresentados os valores referentes aos parâmetros relacionados com as propriedades funcionais do sumo. Valores com as mesmas letras não são significativamente diferentes.

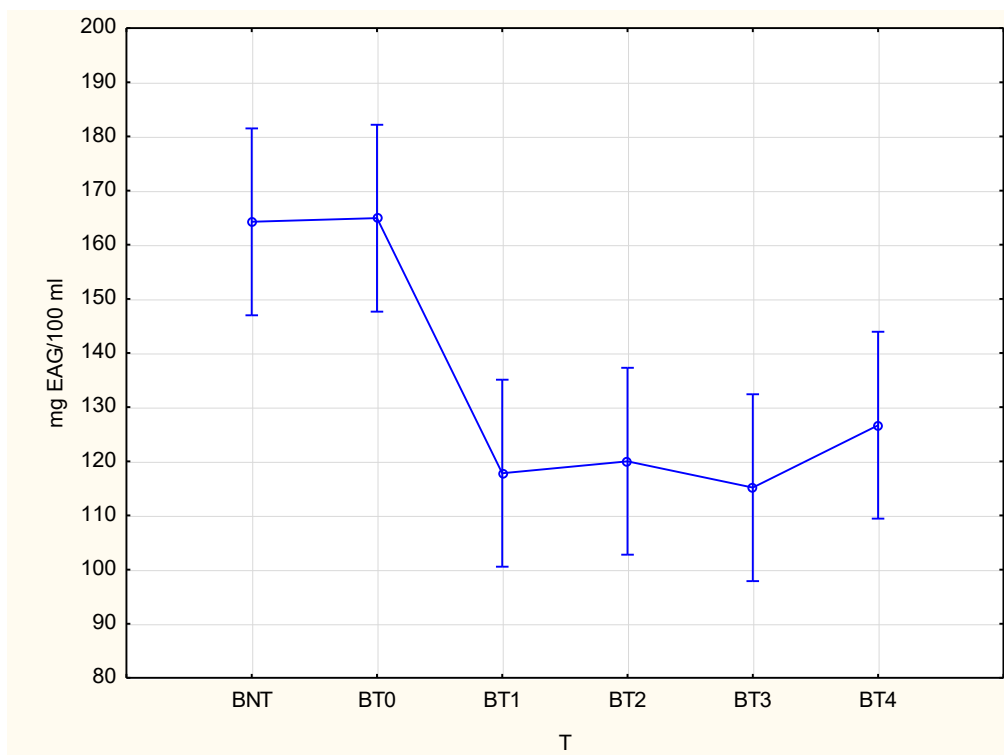
**Tabela 4.3.** Teor de polifenóis totais, FRAP, TEAC e ácido ascórbico (média  $\pm$  DP,  $n \geq 3$ ). Índices diferentes na mesma coluna, traduzem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Amostras	Polifenóis Totais (mg EAG/100 mL)	FRAP (mmol Fe <sup>2+</sup> /L)	TEAC (mmol TE/L)	Ácido Ascórbico ( $\mu$ g/mL)
BNT	164,2 $\pm$ 15,8 <sup>bc</sup>	44,3 $\pm$ 2, 14 <sup>c</sup>	33,83 $\pm$ 1,71 <sup>b</sup>	72,7 $\pm$ 3,4 <sup>b</sup>
BT0	164,9 $\pm$ 6,7 <sup>c</sup>	41,8 $\pm$ 0,48 <sup>c</sup>	35,03 $\pm$ 1,65 <sup>b</sup>	76,1 $\pm$ 4,5 <sup>b</sup>
BT1	117,8 $\pm$ 16,5 <sup>a</sup>	32,8 $\pm$ 0,85 <sup>b</sup>	24,48 $\pm$ 2,04 <sup>a</sup>	79,2 $\pm$ 7,3 <sup>b</sup>
BT2	120,0 $\pm$ 6,7 <sup>a</sup>	27,4 $\pm$ 1,12 <sup>a</sup>	23,68 $\pm$ 1,82 <sup>a</sup>	64,6 $\pm$ 5,8 <sup>a</sup>
BT3	115,1 $\pm$ 15,0 <sup>a</sup>	24,5 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>	25,25 $\pm$ 2,24 <sup>a</sup>	74,5 $\pm$ 7,1 <sup>b</sup>
BT4	126,7 $\pm$ 17,2 <sup>ab</sup>	22,7 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>	23,79 $\pm$ 1,10 <sup>a</sup>	68,2 $\pm$ 6,3 <sup>a</sup>

### 4.2.1. Polifenóis totais

Como se pode observar pelo gráfico da Figura 4.9, a aplicação do tratamento de HPP não teve qualquer influência sobre a concentração de fenóis presentes no sumo. Antes da aplicação do tratamento, o valor é de 164,2 mg EAG/100 ml e logo após o tratamento é de 164,9 mg EAG/100 ml. Contudo, durante a primeira semana de conservação a 3°C $\pm$ 1°C, o teor de fenóis totais baixou significativamente, para 117,8 mg EAG/100 mL. Contudo, durante as últimas três semanas de armazenamento, não houve diferenças significativas nos valores obtidos.

Com os resultados obtidos podemos concluir, que aplicação do tratamento não teve impacto na concentração de fenóis totais presentes nas amostras do sumo. Este comportamento que também se verificou no estudo descrito por Varela-Santos *et al.*, (2012).



**Figura 4.9.** Fenóis totais antes da aplicação do tratamento (BNT) e após o tratamento no tempo 0 (BT0) e durante as 4 semanas de armazenamento (BT 1, BT2, BT3 e BT4).

Por outro lado, ao longo do armazenamento a concentração de fenóis totais diminuiu, passou de 164,9 mg EAG/mL para 126,7 mg EAG/mL. Fenómeno semelhante foi observado por Varela-Santos *et al.* (2012), com um decréscimo de 39,6%. Estes comportamentos levam-nos a concluir que a concentração de fenóis totais não varia com aplicação do tratamento, mas sim durante o período de armazenamento. Este comportamento verificou-se também num estudo realizado em que o objetivo era a comparação da qualidade do morango durante o período de armazenamento, sendo este tratado por altas pressões hidrostáticas e por processos térmicos (Gao *et al.*, 2016).

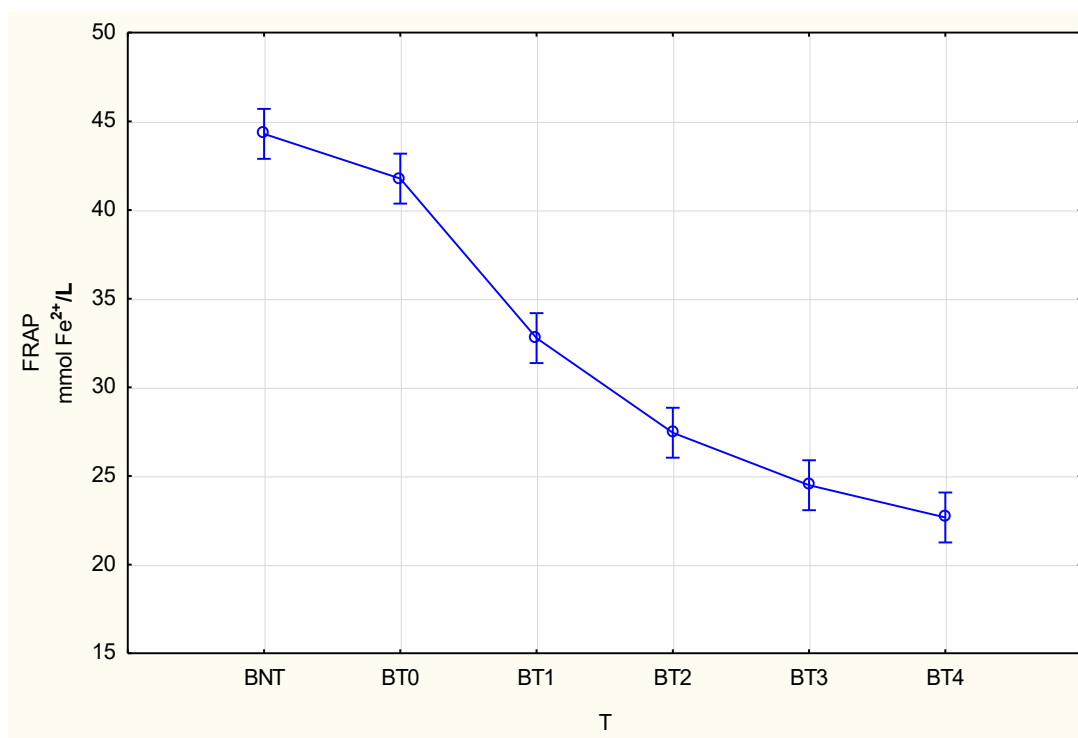
Um estudo realizado ao puré de morango tratado por HPP evidencia que o teor de fenóis totais não tem variações significativas logo após aplicação do tratamento. Contudo, este estudo também refere que a concentração total de fenóis vai variando ao longo do tempo de armazenamento. Uma das causas que apontam para este comportamento é a presença de enzimas que não foram devidamente inativadas com o tratamento e a presença de oxigénio no interior das amostras (Yuan *et al.*, 2018). Noutro estudo realizado ao sumo de arónia (200, 400 e 600 MPa, 15 min) verificou-se uma redução de 36% no total de fenóis durante o seu período de armazenamento a 4°C (Błaszczak *et al.*, 2017).

Há autores que defendem que a diminuição dos fenóis totais durante o seu armazenamento é devido à não inativação total de enzimas como a polifenoloxidase e peroxidase que são responsáveis pela degradação de compostos fenólicos (Błaszczak *et al.*, 2017).

Existe ainda quem defenda que a concentração de polifenóis aumenta logo após aplicação do tratamento e que vai diminuindo ao longo do armazenamento (Ferrari *et al.*, 2010; Putnik *et al.*, 2018; Varela-Santos *et al.*, 2012).

#### 4.2.2. FRAP

Na Figura 4.10 está representado a evolução da capacidade antioxidante avaliada pelo método FRAP.



**Figura 4.10.** Avaliação da capacidade antioxidante, antes da aplicação do tratamento (BNT) e após o tratamento no tempo 0 (BT0) e durante as 4 semanas de armazenamento (BT1, BT2, BT3 e BT4).

Após aplicação do tratamento houve um ligeiro decréscimo nos valores obtidos para a capacidade antioxidante, mas não são estatisticamente significativos ( $p > 0,05$ ). Desde a primeira semana de armazenamento a  $3^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , até ao fim do armazenamento a capacidade antioxidante foi diminuindo gradualmente. A variação foi mais intensa na primeira semana, diminuindo com o tempo, estabilizando à volta de  $20 \text{ mmol F}^{2+}/\text{L}$ , o

que em termos de atividade antioxidante avaliada por este método pode ser considerada razoável.

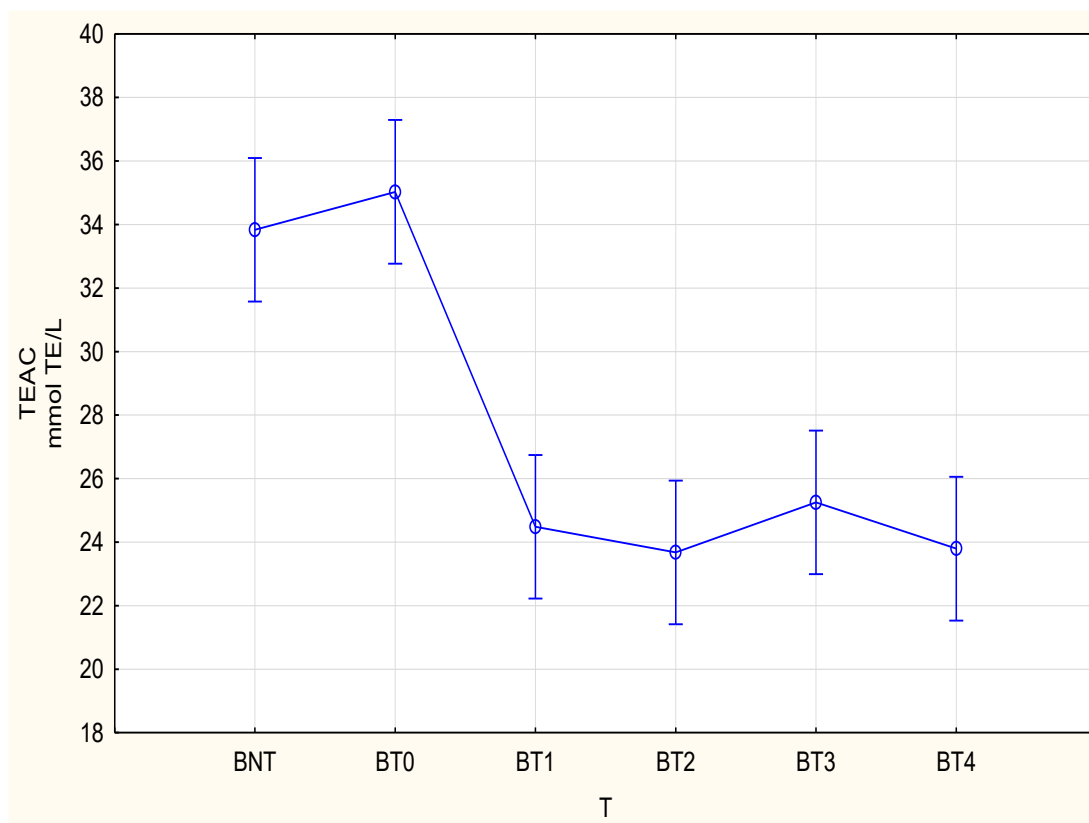
Num estudo realizado a puré de morango (400 MPa, 5 min) também se verificou que logo após aplicação do tratamento, os resultados em relação ao FRAP diminuíram um pouco, mas não foram significativamente relevantes (Yuan *et al.*, 2018). Noutro estudo realizado ao sumo de arónia em que foi aplicado o tratamento de HPP (200–600 MPa, 15 min), também se verificou que durante o armazenamento ocorreu a maior diferença na capacidade oxidante, comparativamente com o sumo em fresco sem qualquer aplicação de tratamento (Błaszczak *et al.*, 2017).

Com os resultados obtidos podemos concluir que o tratamento não tem influência significativa ( $p > 0,05$ ) na capacidade antioxidante do sumo de romã e morango, contudo durante o seu armazenamento o sumo vai perdendo a sua capacidade antioxidante.

#### **4.2.3. TEAC**

Foi usado também o TEAC, para avaliação da capacidade antioxidantes. Os resultados estão apresentados no gráfico da Figura 4.11.

Com aplicação do tratamento de HPP não houve alterações muito significativas em relação a amostra que não sofreu qualquer tipo de tratamento (BNT). Contudo, na primeira semana de armazenamento a  $3^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  houve uma descida nos valores obtidos, mantendo-se depois, ao longo das restantes três semanas de armazenamento (24 mmol TE/L), o que ainda traduz uma capacidade antioxidante importante.



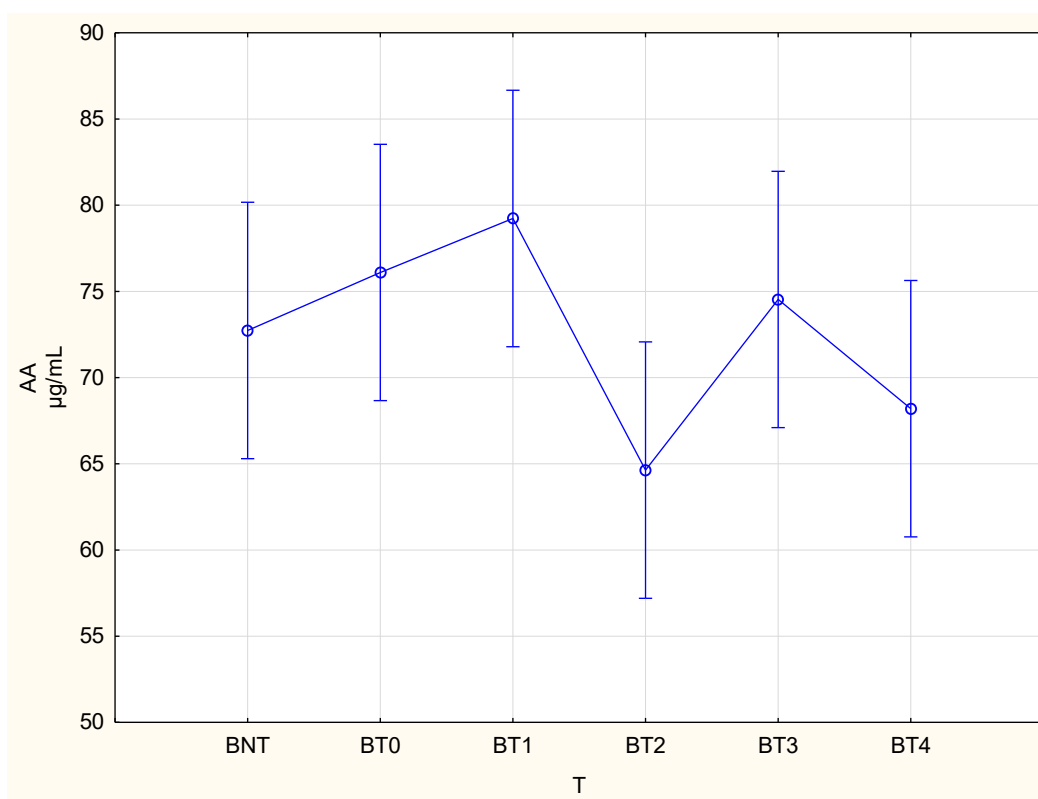
**Figura 4.11.** Avaliação da capacidade antioxidante, antes da aplicação do tratamento (BNT) e após o tratamento no tempo 0 (BT0) e durante as 4 semanas de armazenamento (BT 1, BT2, BT3 e BT4).

Em ambos os ensaios verificou-se que aplicação do tratamento por HPP não teve diferenças significativas na capacidade antioxidante do sumo, mas ao longo do ensaio essa capacidade foi diminuindo. Com os resultados obtidos podemos concluir que o armazenamento do sumo pode levar a um abaixamento da atividade antioxidante, mas ainda mantendo-se em valores importantes. Assim poder-se-á dizer que houve na primeira semana de estudo alguma perda de propriedades funcionais do sumo, mas mantendo-se ainda em níveis consideráveis.

Esta alteração na capacidade antioxidante do sumo de romã pode ser devido ao aumento da formação de polímeros de antocianinas que são formados durante o armazenamento (Subasi & Alpas, 2017). Outros estudos revelam que a capacidade antioxidante do sumo de romã pode aumentar durante o armazenamento devido aos polímeros de antocianinas que se podem desenvolver durante o armazenamento (Varela-Santos *et al.*, 2012)

#### 4.2.4. Ácido ascórbico

A concentração de ácido ascórbico não variou após o tratamento. Antes a sua concentração era de 72,7 µg/mL e logo após houve uma ligeira subida para 76,1 µg/mL, como se poder observar no gráfico da Figura 4.12. Durante as quatro semanas de armazenamento a 3°C±1°C os valores apresentam alguma oscilação, mas não apresentam diferenças significativas ( $p > 0,05$ ). Assim pode-se considerar que globalmente o teor de ácido ascórbico variou muito pouco. Contudo, ao fim das quatro semanas de armazenamento existe um decréscimo do valor comparativamente com a primeira semana de armazenamento. Na primeira semana de armazenamento o valor é de 79,2 µg/mL e na quarta semana de armazenamento é de 68,2 µg/mL.



**Figura 4.12.** Teor de ácido ascórbico, antes da aplicação do tratamento (BNT) e após o tratamento no tempo 0 (BT0) e durante as 4 semanas de armazenamento (BT 1, BT2, BT3 e BT4).

Diminuição na concentração do ácido ascórbico durante o armazenamento já tinha sido verificada noutros estudos. Num estudo realizado ao sumo de maçã em que foi aplicado o tratamento por HPP, verificou-se um decréscimo no ácido ascórbico de 211,75 mg/kg (1 dia a 4 °C) para 1,83 mg/kg (3º dia 4°C) (Juarez-Enriquez *et al.*, 2015).



### 4.3. Avaliação nutricional

A avaliação nutricional foi feita antes da aplicação do tratamento por HPP (BNT) e imediatamente após (BT0). Os resultados obtidos resultam da avaliação composta de três sacos previamente homogeneizados. Na Tabela 4.4 estão representados os valores nutricionais obtidos, de acordo com regulamento UE (1169/2011) que estipula as menções obrigatórias a constar na rotulagem.

**Tabela 4.4. Valores nutricionais obtidos antes e após aplicação do tratamento.**

<b>Amostras</b>		
<b>Valores Nutricionais por 100ml</b>	<b>Bebida não tratada (BNT)</b>	<b>Bebida Tratada (BT)</b>
<b>Valor energético</b>	209 kJ / 49 kcal	193 kJ / 46 kcal
<b>Lípidos</b>	<0.1 g	<0.1 g
<b>Dos quais ácidos gordos saturados</b>	<0.1 g	<0.1 g
<b>Hidratos de carbono</b>	12 g	11 g
<b>dos quais açúcares</b>	10 g	10 g
<b>Proteína</b>	0.5 g	0.5 g
<b>Fibra dietética</b>	1g	0.4 g
<b>Sal</b>	0 g	0 g

Como se pode observar não houve alterações significativas a nível nutricional com aplicação do tratamento de HPP. Estes resultados confirmam os obtidos por Abera, (2019), Gopal (2018) e Hadidi *et al.*, 2014).

### 4.4. Caracterização microbiológica

Antes da aplicação do tratamento as amostras apresentam uma contaminação muito elevada, a nível fecal e bolores.

Apesar de não existir legislação específica para este tipo de bebida, podemos concluir com os resultados obtidos, que este tipo de produto não pode ir para o mercado sem aplicação de qualquer tipo de tratamento. Na Tabela 4.5 encontram-se os resultados obtidos antes e após o tratamento.

**Tabela 4.5. Efeito do tratamento de HPP e do tempo de prateleira na qualidade microbiológica do sumo.**

			<b>Contagem total a 30°C Aeróbios Mesofilos (UFC/mL)</b>	<b>Psicrófilos (UFC/mL)</b>	<b>Coliformes VRBL (UFC/mL)</b>	<b>Bolores e leveduras (UFC/mL)</b>
<b>Bebida Não Tratada</b>	<b>T0</b>	<b>Amostra 1</b>	$7,9 \times 10^2$	$>3,0 \times 10^2$	$6,6 \times 10^1$	$>1,5 \times 10^3$
		<b>Amostra 2</b>	$7,5 \times 10^2$	$>3,0 \times 10^2$	$>3,0 \times 10^2$	$>1,5 \times 10^3$
<b>Bebida Tratada</b>	<b>T0</b>	<b>Amostra 1</b>	$5,0 \times 10^0$	$6,0 \times 10^0$	$1,5 \times 10^0$	$<1,0$
		<b>Amostra 2</b>	$5,0 \times 10^0$	$<1,0$	$<1,0$	$<1,0$
	<b>T1</b>	<b>Amostra 1</b>	$2,3 \times 10^1$	$<1,0$	$<1,0$	$2,7 \times 10^1$
		<b>Amostra 2</b>	$1,5 \times 10^1$	$<1,0$	$<1,0$	$1,0 \times 10^0$
	<b>T2</b>	<b>Amostra 1</b>	$4,7 \times 10^1$	$<1,0$	$1,0 \times 10^0$	$1,0 \times 10^0$
		<b>Amostra 2</b>	$3,0 \times 10^0$	$<1,0$	$1,0 \times 10^0$	$1,0 \times 10^0$
	<b>T3</b>	<b>Amostra 1</b>	$2,0 \times 10^0$	$<1,0$	$4,5 \times 10^0$	$9,0 \times 10^0$
		<b>Amostra 2</b>	$3,0 \times 10^0$	$<1,0$	$1,5 \times 10^1$	$7,0 \times 10^0$
	<b>T4</b>	<b>Amostra 1</b>	$2,4 \times 10^1$	$2,0 \times 10^0$	$<1,0$	$1,5 \times 10^1$
		<b>Amostra 2</b>	$1,3 \times 10^1$	$5,0 \times 10^0$	$<1,0$	$<1,0$

Em relação aos coliformes, logo após o tratamento existe uma redução destes, pelo que podemos concluir que este tipo de tratamento é eficaz para estes microrganismos. Na primeira semana de armazenamento não se verificou a presença destes microrganismos, contudo na segunda e terceira semana de armazenamento verificou-se a presença destes. Já na quarta semana este tipo de microrganismos não voltou a manifestar-se. Assim estes resultados não são conclusivos.

Em relação aos bolores e leveduras, verificou-se também que este tipo de tratamento é eficaz, eliminando a sua presença das amostras em estudo.

Em relação à contagem de microrganismos totais também se verificou que o tratamento aplicado foi eficaz. A partir da primeira semana de armazenamento verificou-se a presença, mas mínima deste tipo de microrganismos que assim se manteve até ao final do estudo.

O período de armazenamento estendeu-se durante quatro semanas estando estas amostras sujeitas a uma temperatura de  $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após estas quatro semanas verificou-se que a nível microbiológico os resultados obtidos foram satisfatórios, eventualmente podendo-se ainda prolongar o período de tempo de prateleira.

## **5. Conclusões**

O tratamento por altas pressões hidrostáticas (600 MPa, 480s, 10 °C), utilizado neste estudo, não teve influência negativa a nível físico-químico e nutricional.

A nível microbiológico, podemos concluir que o tratamento aplicado conferiu estabilidade microbiológica ao sumo.

Um dos objetivos desta dissertação, para além de perceber o impacto que este tipo de tratamento poderia ter no sumo, era perceber como seria o comportamento deste durante o seu armazenamento, ou seja, a vida útil do produto. Durante o seu armazenamento (3°C ±1°C) já se verificou algumas diferenças significativas em relação às amostras tratadas. Essas alterações que continuaram, mas de modo mais atenuado, verificaram-se para os valores de fenóis totais, FRAP e TEAC. Ao fim das quatro semanas essas alterações estabilizaram e estes parâmetros mantiveram-se em valores, ainda assim, bastante interessantes. Quanto ao teor de ácido ascórbico manteve-se estável apesar de apresentar umas ligeiras oscilações.

O tratamento por altas pressões hidrostáticas não tem repercussões negativas a nível físico-químico e nutricional no sumo de romã e morango e apresentou-se eficaz em relação a inativação dos microrganismos presentes. Durante o tempo de prateleira, houve inicialmente um decréscimo acentuado de alguns parâmetros funcionais, que tenderam subsequentemente para uma estabilização, mantendo-se ainda em níveis importantes.

### **5.1. Perspetivas Futuras**

Para melhor avaliar o impacto que este tipo de tratamento tem neste sumo, os seguintes estudos deverão ser realizados:

- utilizar várias condições de tratamento para verificar quais as que mais se adequam a este tipo de produto, usando várias combinações de tempo e pressão;
- ensaiar várias técnicas de extração do sumo de modo a avaliar se estas têm influência nas características do sumo, antes e após o tratamento por HPP, e durante o seu período de armazenamento;
- efetuar uma análise sensorial;
- avaliar o efeito sobre os pigmentos, nomeadamente sobre as antocianinas.

## 6. Bibliografia

- Aaby, K., Grimsbo, I. H., Hovda, M. B., & Rode, T. M. (2018). Effect of high pressure and thermal processing on shelf life and quality of strawberry purée and juice. *Food Chemistry*, 260, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.100>
- Abera, G. (2019). Review on High Pressure Processing of Foods. *Cogent Food & Agriculture*, 0(0). <https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1568725>.
- AOAC (1998). Official Method 920.151. Solids (total) in Fruits and Fruit Products. *Official Methods of Analysis, AOAC International*. 16th Edition 4th Revision (1998). AOAC International, Gaithersburg, USA.
- AOAC (1998). Official Method 940.26. Ash of Fruits and Fruit Products. *Official Methods of Analysis, AOAC International*. 16th Edition 4th Revision (1998). AOAC International, Gaithersburg, USA.
- Błaszczak, W., Amarowicz, R., & Górecki, A. R. (2017). Antioxidant capacity, phenolic composition and microbial stability of aronia juice subjected to high hydrostatic pressure processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 39, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.12.005>
- Cao, X., Bi, X., Huang, W., Wu, J., Hu, X., & Liao, X. (2012). Changes of quality of high hydrostatic pressure processed cloudy and clear strawberry juices during storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.05.008>
- Ferrari, G., Maresca, P., & Ciccarone, R. (2010). The application of high hydrostatic pressure for the stabilization of functional foods: Pomegranate juice. *Journal of Food Engineering*, 100(2), 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.04.006>
- Gao, G., Ren, P., Cao, X., Yan, B., Liao, X., Sun, Z., & Wang, Y. (2016). Comparing quality changes of cupped strawberry treated by high hydrostatic pressure and thermal processing during storage. *Food and Bioprocess Processing*, 100, 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.06.017>

- Geometry, R., & Analysis, G. (n.d.). *Pomegranate Production and Marketing*.
- Gopal, K. R. (2018). High Pressure Processing of Fruits and Vegetable Products: A Review. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 5(5), 680–692. <https://doi.org/10.18782/2320-7051.2930>
- Hadidi, M., Lleida, U. De, & Akbarian, M. (2014). Effect of High pressure processing of food characteristics: a review of quality aspect. *International Journal of Biosciences (IJB)*, (April), 193–205. <https://doi.org/10.12692/ijb/4.10.193-205>
- Hmid, I., Hanine, H., Elothmani, D., & Oukabli, A. (2018). The physico-chemical characteristics of Moroccan pomegranate and evaluation of the antioxidant activity for their juices I. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(3), 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.06.002>
- Juarez-Enriquez, E., Salmeron-Ochoa, I., Gutierrez-Mendez, N., Ramaswamy, H. S., & Ortega-Rivas, E. (2015). Shelf life studies on apple juice pasteurised by ultrahigh hydrostatic pressure. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 915–919. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.041>
- Manthou, E., Georgakouli, K., & Deli, C. K. (2017). *Effect of pomegranate juice consumption on biochemical parameters and complete blood count*. 1756–1762. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4690>
- Mphahlele, R. R., Fawole, O. A., Mokwena, L. M., & Linus, U. (2016). South African Journal of Botany Effect of extraction method on chemical , volatile composition and antioxidant properties of pomegranate juice. *South African Journal of Botany*, 103, 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.09.015>
- Putnik, P., Kresoja, Ž., Bosiljkov, T., Jambrak, A. R., Barba, F. J., Lorenzo, J. M., ... Jambrak, A. R. (2018). Comparison the effects of thermal and non-thermal technologies on pomegranate juice quality : A review Danijela Bursać Kovačević , PhD. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.131>
- Šamec, D., Maretić, M., Lugarić, I., Mešić, A., Salopek-Sondi, B., & Duralija, B. (2016). Assessment of the differences in the physical, chemical and phytochemical properties of four strawberry cultivars using principal component analysis. *Food*

*Chemistry*, 194, 828–834. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.095>

Subasi, B. G., & Alpas, H. (2017). Effect of high hydrostatic pressure processing and squeezing pressure on some quality properties of pomegranate juice against thermal treatment. *High Pressure Research An International Journal*, 7959(April). <https://doi.org/10.1080/08957959.2016.1263840>

UE (2011). Regulamento (UE) n.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 304/18 - L 304/62.

Varela-Santos, E., Ochoa-Martinez, A., Tabilo-Munizaga, G., Reyes, J. E., Pérez-Won, M., Briones-Labarca, V., & Morales-Castro, J. (2012). Effect of high hydrostatic pressure (HHP) processing on physicochemical properties, bioactive compounds and shelf-life of pomegranate juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 13(JANUARY), 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.10.009>

Wael M. Elamin, Johari B. Endan, Yus A. Yosuf, R. S., & Ahmedov, A. (2015). *J estr.* (December). <https://doi.org/10.25103/jestr.085.11>

Yuan, B., Danao, M. G. C., Lu, M., Weier, S. A., Stratton, J. E., & Weller, C. L. (2018). High pressure processing (HPP) of aronia berry puree: Pilot scale processing and a shelf-life study. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 47(March), 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.03.006>